

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

In re Patent Application of:  
Yosuke Iwata

Application No.: NEW APPLICATION

Confirmation No.: N/A

Filed: December 3, 2003

Art Unit: N/A

For: LIQUID CHROMATOGRAPH

Examiner: Not Yet Assigned

**CLAIM FOR PRIORITY AND SUBMISSION OF DOCUMENTS**

MS Patent Application  
Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

Dear Sir:

Applicant hereby claims priority under 35 U.S.C. 119 based on the following prior foreign application filed in the following foreign country on the date indicated:

<u>Country</u>	<u>Application No.</u>	<u>Date</u>
Japan	2002-375103	December 25, 2002

In support of this claim, a certified copy of the said original foreign application is filed herewith. Applicant believes no fee is due with this response. However, if a fee is due, please charge our Deposit Account No. 18-0013, under Order No. NOG-0020 from which the undersigned is authorized to draw.

Dated: December 3, 2003

Respectfully submitted,

By 

David T. Nikaido

Registration No.: 22,663

Lee Cheng

Registration No.: 40,949

RADER, FISHMAN & GRAUER PLLC

1233 20th Street, N.W., Suite 501

Washington, DC 20036

(202) 955-3750

Attorney for Applicant

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2002年12月25日

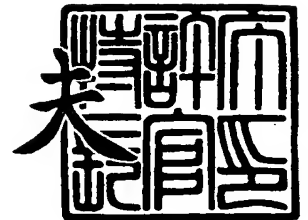
出願番号  
Application Number: 特願2002-375103  
[ST. 10/C]: [JP2002-375103]

出願人  
Applicant(s): 株式会社島津製作所  
エーザイ株式会社

2003年10月 3日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井 康夫



出証番号 出証特2003-3081775

【書類名】 特許願

【整理番号】 K1020356-1

【提出日】 平成14年12月25日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 30/02

【発明者】

    【住所又は居所】 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所内

    【氏名】 岩田 庸助

【特許出願人】

    【識別番号】 000001993

    【氏名又は名称】 株式会社島津製作所

【特許出願人】

    【識別番号】 000000217

    【氏名又は名称】 エーザイ株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100085464

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 野口 繁雄

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 037017

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 図面 1

    【物件名】 要約書 1

    【包括委任状番号】 9110906

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 液体クロマトグラフ

【特許請求の範囲】

【請求項1】 試料注入部から注入された試料を1次元目分析用移動相により1次元目分析カラムに導いて分離し、分離された成分を溶離液とともに分画して分取部に保持する分画用流路と、

前記分取部に保持された成分と溶離液を希釈液によりトラップカラムに送り出して前記成分をトラップカラムに捕捉させて濃縮させるトラップ用流路であって、前記希釈液をトラップカラムへ流す流路は、前記分取部を経由する第1の希釈液流路と、前記分取部の下流で第1の希釈液流路に希釈液を合流させる第2の希釈液流路とからなり、これら第1、第2の希釈液流路はそれぞれ独立して流量を設定できる送液ポンプを備えているトラップ用流路と、

前記トラップカラムに捕捉された成分を2次元目分析用移動相により2次元目分析カラムに導いて分析する分析流路とを備えたことを特徴とする液体クロマトグラフ。

【請求項2】 前記第1、第2の希釈液流路に設けられた送液ポンプの少なくとも一方は前記1次元目分析用移動相の送液用ポンプを兼ねており、

その送液ポンプの上流には前記1次元目分析用移動相と希釈液との供給を切り替える切替えバルブが設けられている請求項1に記載の液体クロマトグラフ。

【請求項3】 前記トラップカラムには少なくともトラップカラム内に存在する移動相を重水素化溶媒に置換するNMR用置換流路が接続されている請求項1から3のいずれかに記載の液体クロマトグラフ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、高速液体クロマトグラフなどの液体クロマトグラフに関し、特に分離した成分をトラップカラムに捕捉して濃縮する機能を備えた液体クロマトグラフに関するものである。

【0002】

**【従来の技術】**

これまでの2次元高速液体クロマトグラフィは、1次元目の分析でカラムの下流側で1つ以上の分析対象成分を含む溶離液を分画してトラップカラムなどに分析対象成分を吸着させ、トラップカラムに吸着している分析対象成分を離脱させて2次元目の分析で再分析を行うというものであった。

**【0003】**

トラップカラムへ分析対象成分を吸着させる際、分析対象成分のトラップカラムへの吸着効率を高めるため溶離液に溶媒強度を弱める移動相を希釈液として同時に流している。その溶離液と希釈液との混合比率、すなわち希釈率は抵抗管を用いて決定している。

**【0004】****【発明が解決しようとする課題】**

濃縮液をトラップカラムへ流す際、1次元目の分析で分画された溶離液をトラップカラムへと搬送する液と希釈を行なう希釈液との比率が吸着効率を大きく左右するが、これまでの装置では、希釈率の選択が抵抗管を用いてなされているため、希釈率は $1/3$ 、 $1/6$ 、 $1/10$ というような幾つかの値に制限されており、いろいろな希釈率に対応できなかった。

**【0005】**

本発明は、1次元目の分析で分離され分画された試料成分と溶離液をトラップカラムへ導く際、それらをトラップカラムへ搬送する液と希釈液との比率を自由に設定できるようにすることを目的とするものである。

**【0006】****【課題を解決するための手段】**

本発明では、希釈液をトラップカラムへ流す際、1次元目の分析で分画された溶離液をトラップカラムへと搬送する液と希釈を行う濃縮液とを別々のポンプにより送液することにより自由な希釈率の選択を可能とした。

**【0007】**

すなわち、本発明の液体クロマトグラフは、試料注入部から注入された試料を1次元目分析用移動相により1次元目分析カラムに導いて分離し、分離された成

分を溶離液とともに分画して分取部に保持する分画用流路と、前記分取部に保持された成分と溶離液を希釈液によりトラップカラムに送り出して前記成分をトラップカラムに捕捉させて濃縮させるトラップ用流路と、前記トラップカラムに捕捉された成分を2次元目分析用移動相により2次元目分析カラムに導いて分析する分析流路とを備えており、そのトラップ用流路で希釈液をトラップカラムへ流す流路は、分取部を経由する第1の希釈液流路と、分取部の下流で第1の希釈液流路に希釈液を合流させる第2の希釈液流路とからなり、これら第1、第2の希釈液流路はそれぞれ独立して流量を設定できる送液ポンプを備えている。

このように、トラップ用流路では第1、第2の希釈液流路の流量を独立して設定できるため、希釈率の選択が自由に行える。

#### 【0008】

##### 【発明の実施の形態】

好ましい形態では、第1、第2の希釈液流路に設けられた送液ポンプの少なくとも一方は1次元目分析用移動相の送液用ポンプを兼ねており、その送液ポンプの上流には1次元目分析用移動相と希釈液との供給を切り替える切替えバルブが設けられている。このように、1次元目分析用移動相と希釈液とで送液ポンプを兼ねることにより、液体クロマトグラフの装置コストが低下する利点がある。

#### 【0009】

さらに他の好ましい形態では、トラップカラムには少なくともトラップカラム内に存在する移動相を重水素化溶媒に置換するNMR（核磁気共鳴）用置換流路が接続されている。これにより、トラップカラムに捕捉された成分は溶出されることなくそのまま捕捉されつづけ、移動相が重水素化溶媒に置換されることにより、NMR分析が可能になる。また、置換される容量をトラップカラムとそれにつながる僅かな流路に限定することができるので、高価な重水素化溶媒の使用量を抑えることもできる。

#### 【0010】

次に、図面を参照して実施例を詳細に説明する。

##### 【実施例1】

図1は第1の実施例を表す。

一次元目分析用移動相と希釈液を供給するために互いに独立に流量を設定することのできる2台の送液ポンプ2 aと2 bが設けられている。送液ポンプ2 aには1次元分析用移動相である有機溶媒4 aと希釈液6 aの流路が接続されている。有機溶媒4 aと希釈液6 aはガスの混入を防止するオンラインデガッサ8から切替バルブ10を介して送液ポンプ2 aに接続されており、切替バルブ10によって有機溶媒4 aと希釈液6 aの何れかの流路が切り替えて接続されるようになっている。同様に、他方の送液ポンプ2 bには1次元分析用移動相である水4 bと希釈液6 bの流路が接続されている。水4 bと希釈液6 bもオンラインデガッサ8から切替バルブ10を介して送液ポンプ2 bに接続されており、切替バルブ10によって水4 bと希釈液6 bの何れかの流路が切り替えて接続されるようになっている。

#### 【0011】

希釈液6 aと6 bは同じものであり、移動相4 a, 4 bに応じてトラップカラムへの吸着効率を高めるような溶媒を選択して使用する。

送液ポンプ2 aと2 bの下流の流路は切替バルブ12を介して両流路の液を混合するミキサ14に接続され、ミキサ14で混合された溶液の流路が試料導入部であるオートサンプラ16を介して1次元目分析カラム18に接続されている。

#### 【0012】

分析カラム18の下流の流路はUV（紫外線）検出器20に接続され、分析カラム18で分離された成分が検出器20で検出されるようになっている。

検出器20の下流の流路は切替バルブ22を介してフラクシオンループ24に接続されている。フラクシオンループ24は2つの分配バルブ26 aと26 bの間に複数の流路を並列に備え、分画した成分と移動相をそれぞれの流路に保持できるようになっている。切替バルブ22にはドレインへつながる流路も接続されている。

#### 【0013】

バルブ12と22の間には2つの流路が接続され、一方の流路は分岐して切替バルブ28に接続されている。切替バルブ28にはトラップカラム30が接

続され、更に２次元目分析カラム 32 も接続されている。分析カラム 32 の下流の流路には UV 検出器 34 が接続されている。

#### 【0014】

２次元目分析用移動相を供給するために２台の送液ポンプ 36a と 36b が設けられている。送液ポンプ 36a, 36b には２次元目分析用移動相である有機溶媒 38a と水 38b 用の流路がオンラインデガッサ 39 を介してそれぞれ接続されている。送液ポンプ 36a と 36b の下流の流路は両流路の液を混合するためのミキサ 40 を介して切替えバルブ 28 に接続されている。

42 はカラムオープンであり、カラム 18 と 30 を一定の温度に保持する。

#### 【0015】

分析カラム 18, 32 としては、順相カラム、逆相カラム、イオン交換カラム、アフィニティクロマトカラム、GPC（ゲル浸透クロマトグラフィ）カラムなど、種々のカラムを分離分析しようとする成分に応じて選択して使用すればよい。トラップカラム 30 としては分析カラム 18, 32 と同種のカラムで短いものを使用することができる。

#### 【0016】

次に、この実施例の動作について説明する。

（１次元目分析）

図 1 は１次元目分析及び分画の工程を表わしたものである。流路で太線で表わされている部分は当該工程の動作を示す流路である。以下の図の説明でも同じである。

#### 【0017】

切替えバルブ 10 により移動相 4a と 4b が選択されている状態で送液ポンプ 2a と 2b が送液を行なう。移動相は切替えバルブ 12 を経てミキサ 14 で混合され、オートサンプラ 16 を経て分析カラム 18 に流れる。オートサンプラ 16 から注入された試料は分析カラム 18 で分離され、溶出して検出器 20 で検出される。検出器 20 でピーク検出が行なわれると、その信号に応じて分配バルブ 26a と 26b が働き、フラクションループ 24 の何れかに分画された試料成分が移動相とともに保持される。



## 【0018】

検出器 20 によりピーク検出が行なわれる毎に分配バルブ 26 a と 26 b が切り替えられてそれぞれのフラクシヨナループ 24 に分画された試料成分と移動相の保持がなされていく。

分析カラム 18 から流出する移動相でフラクシヨナループ 24 に保持されなかったものはドレインへ排出されていく。

## 【0019】

この工程の間も、2 次元分析用移動相 38 a と 38 b がオンラインデガッサ 39 を経て気泡が除去された状態でそれぞれ送液ポンプ 36 a と 36 b により供給され、ミキサ 40 で混合されて送られ、2 次元目分析カラム 32 には移動相が流れてコンディショニングが行われる。

## 【0020】

(濃縮)

次に、フラクシヨナループ 24 に保持された分画成分をトラップカラム 30 に捕捉して濃縮する工程を図 2 に示す。

切替えバルブ 10 が切り替えられて、希釈液 6 a と 6 b が送液ポンプ 2 a と 2 b によって供給される。送液ポンプ 2 b により供給される希釈液は切替えバルブ 12, 22 を通って分配バルブ 26 b から所定のフラクシヨナループ 24 を通り、そのフラクシヨナループ 24 に保持されていた分画成分と移動相が切替えバルブ 26 a から切替えバルブ 22, 28 を通り、トラップカラム 30 に導かれる。このとき、希釈液 6 a がポンプ 2 a から切替えバルブ 12 を経て供給され、フラクシヨナループ 24 を経た流路と合流し、その流路からの移動相を希釈しながらトラップカラム 30 へ導かれる。トラップカラム 30 では試料成分が捕捉されることにより濃縮されていく。トラップカラム 30 を経た移動相と希釈液は切替えバルブ 28 を経てドレインへ排出される。

この工程の間も、2 次元目分析カラム 32 には移動相が流れてコンディショニングが行われている。

## 【0021】

(2 次元目分析)

図3は2次元目分析の工程を表したものである。

2次元分析用移動相38aと38bがオンラインデガッサ39を経て気泡が除去された状態でそれぞれ送液ポンプ36aと36bにより供給され、ミキサ40で混合されて送られる。その混合された移動相は切替えバルブ28を経てトラップカラム30に至り、トラップカラム30に捕捉されていた試料成分を溶出して切替えバルブ28から2次元目分析カラム32に導く。分析カラム32に導かれた試料成分は更にその分析カラム32で分離され、溶出して検出器34で検出される。

#### 【0022】

高速液体クロマトグラフとしては2次元目分析で目的を達成することができる。更に、検出器34の下流に定性分析用の質量分析計(MS)を接続することもできる。その場合には検出器34を経た溶出液を適当なインターフェースを経て質量分析計に導き、検出器34で検出された試料成分の定性分析が行なわれる。

#### 【0023】

##### [実施例2]

図4は第1の実施例に、NMR分析用に重水素化溶媒を置換させる機能を付加した第2の実施例を表す。

図1の実施例の2次元分析用移動相として、2次元目分析の有機溶媒38aとして重水素化有機溶媒を用い、水38bとして重水を用いる。そして、切替えバルブ12、22からの流路、ミキサ40、及び切替えバルブ28の間に切替えバルブ50を挿入し、その切替えバルブ50を介して重水で置換できるように流路を接続した。

#### 【0024】

この実施例では、トラップカラム30に試料成分が濃縮された後、その成分を分析カラム32に導く前に、重水38bを送液ポンプ36bにより供給し、切替えバルブ50からミキサー40を経ずに切替えバルブ28からトラップカラム30を経て切替えバルブ28からドレインまで導く。これにより、トラップカラム30内と、切替えバルブ28とトラップカラム30の間の流路が重水で置換される。これにより、トラップカラム30に捕捉された成分は溶出されることなくそ

のまま捕捉されつづける。

#### 【0025】

次に、切替えバルブ50と28を切り替え、送液ポンプ36aにより重水素化有機溶媒38aを供給し、送液ポンプ36bにより重水38bを供給してグラジエント分析を行なう。このとき、重水素化有機溶媒38aはミキサー40に送られ、重水38bは切替えバルブ50を経てミキサー40に送られてミキサー40で重水素化有機溶媒38aと重水38bが混合してグラジエント分析用移動相となり、その移動相は切替えバルブ28を経てトラップカラム30に至り、トラップカラム30に捕捉されていた試料成分を溶出して切替えバルブ28から2次元目分析カラム32に導く。分析カラム32に導かれた試料成分は更にその分析カラム32で分離され、溶出して検出器34で検出される。

この実施例では移動相が重水素化溶媒に置換されてNMR分析が可能になる。

#### 【0026】

##### 【発明の効果】

本発明では、1次元目の分析で分画され分取部に保持された試料成分と溶離液とを希釈液により希釈してトラップカラムに送り出しその試料成分をトラップカラムに捕捉させて濃縮させるトラップ用流路において、希釈液をトラップカラムへ流す流路を、分取部を経由する第1の希釈液流路と、分取部の下流で第1の希釈液流路に希釈液を合流させる第2の希釈液流路とで構成し、これら第1、第2の希釈液流路がそれぞれ独立して流量を設定できる送液ポンプを備えたので、1次元目の分析で分画された試料成分と溶離液とをトラップカラムへ搬送する際の希釈率を自由に設定することができるようになった。

従来のように希釈率の設定に希釈抵抗管を用いる方法と比較すると、希釈抵抗管の調整が不要になり、工数が減って生産コストが安くなる。また、希釈抵抗管の場合、管壁への異物の混入などにより希釈流量が微妙に変わることもあったが、希釈流量が送液ポンプにより設定されるため常に安定した希釈流量を得ることができる。

##### 【図面の簡単な説明】

#### 【図1】

第 1 の実施例を 1 次元目分析工程の状態を示す流路図である。

【図 2】

第 1 の実施例を濃縮工程の状態を示す流路図である。

【図 3】

第 1 の実施例を 2 次元目分析工程の状態を示す流路図である。

【図 4】

第 2 の実施例を示す流路図である。

【符号の説明】

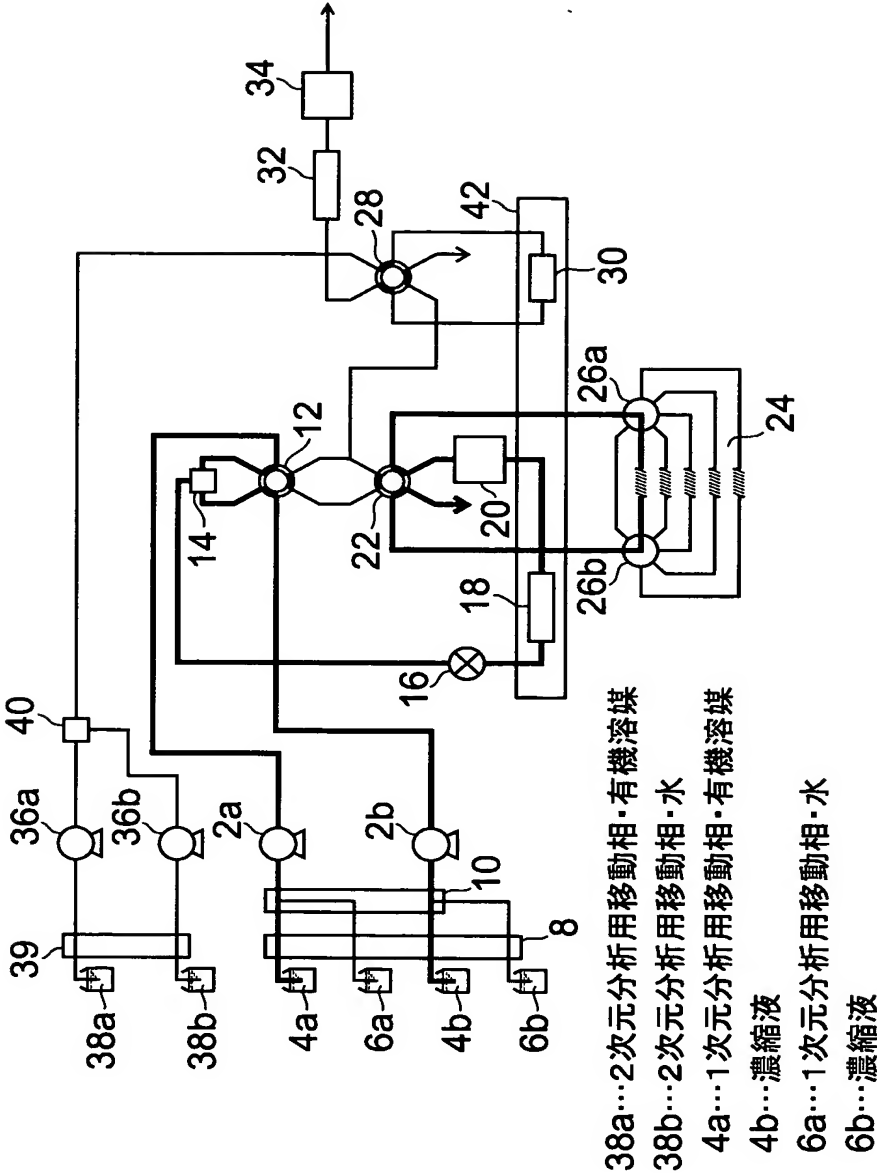
2 a, 2 b, 3 6 a, 3 6 b	送液ポンプ
4 a, 4 b	1 次元分析用移動相
6 a, 6 b	希釈液
8, 3 9	オンラインデガッサ
1 0, 1 2, 2 2, 2 8, 5 0	切替えバルブ
1 4, 4 0	ミキサ
1 6	オートサンプラ
1 8, 3 2	分析カラム
2 0	U V 検出器
2 4	フラクションループ
2 6 a, 2 6 b, 4 2 a, 4 2 b	分配バルブ
3 0	トラップカラム
4 2	カラムオーブン

【書類名】

図面

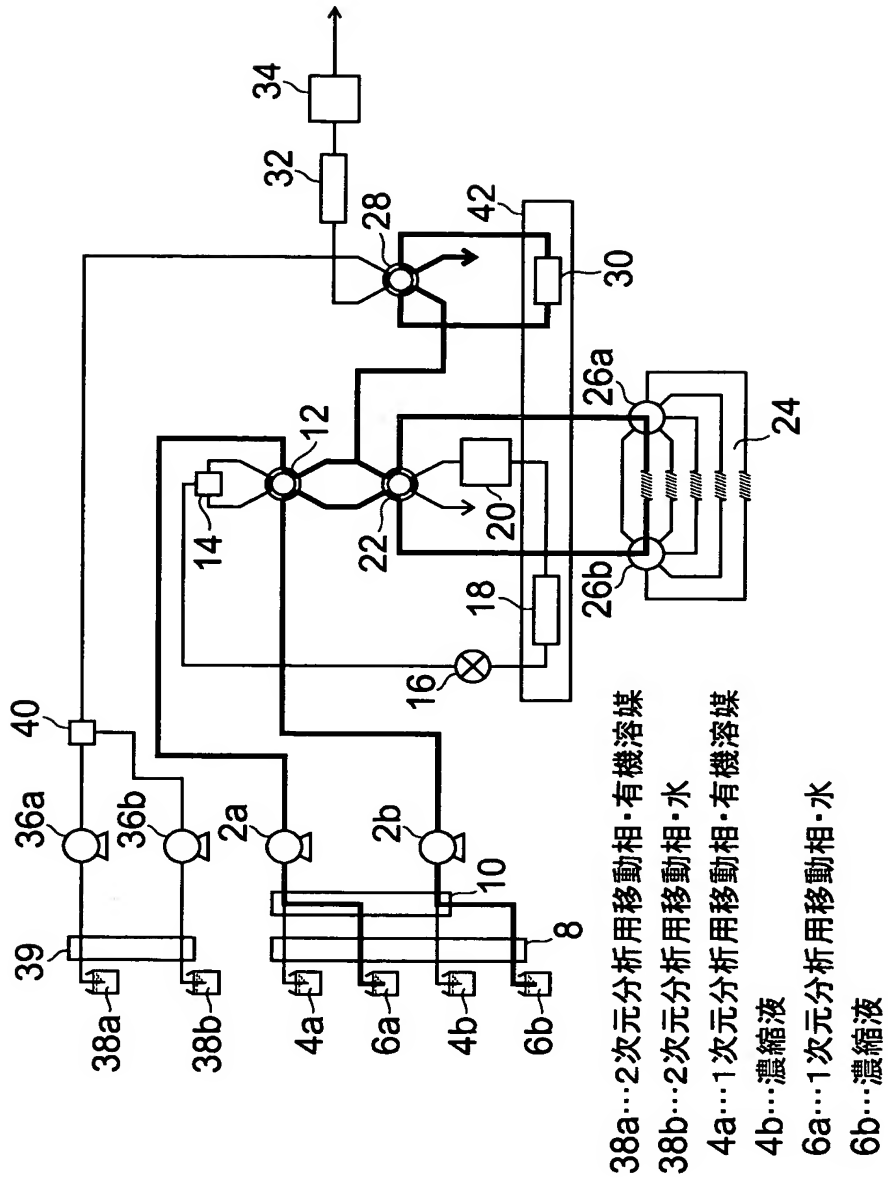
【図 1】

(1)1次元目分析



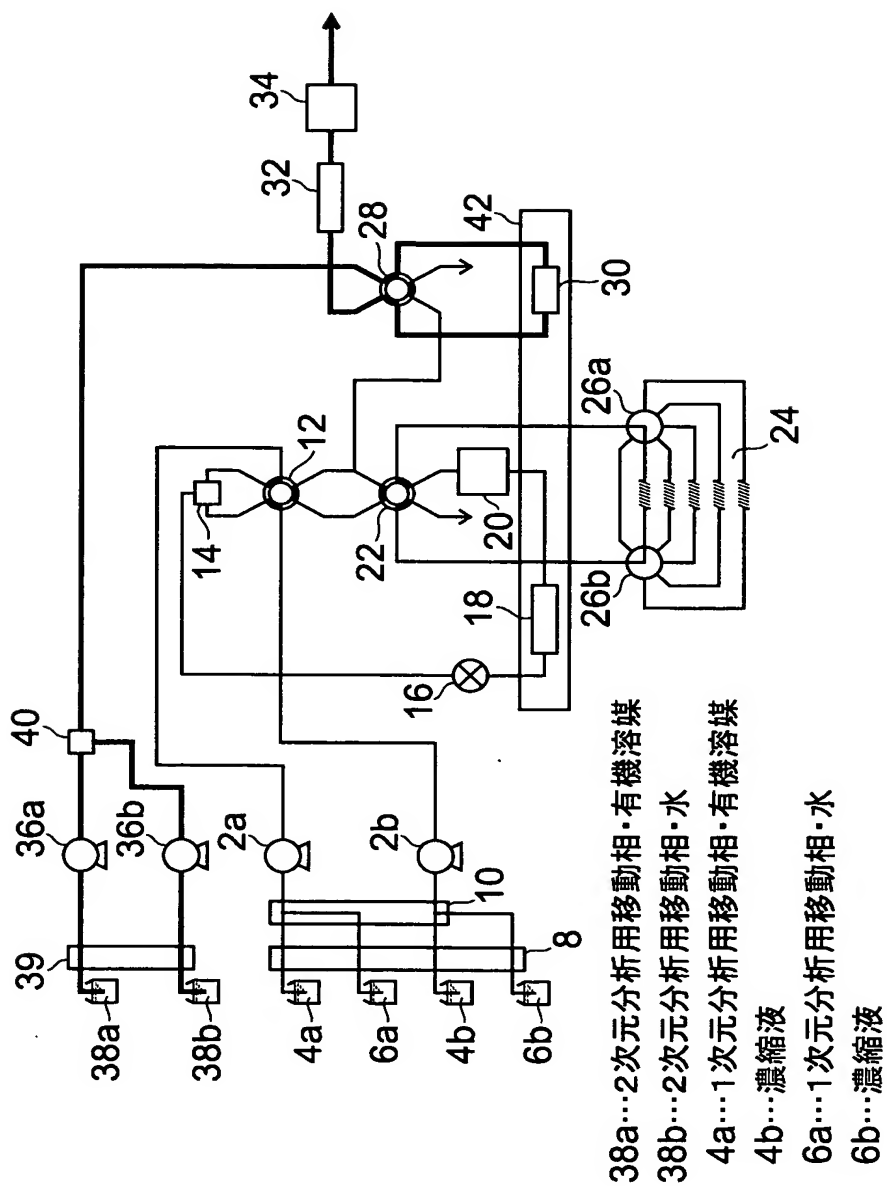
【図 2】

(2)濃縮

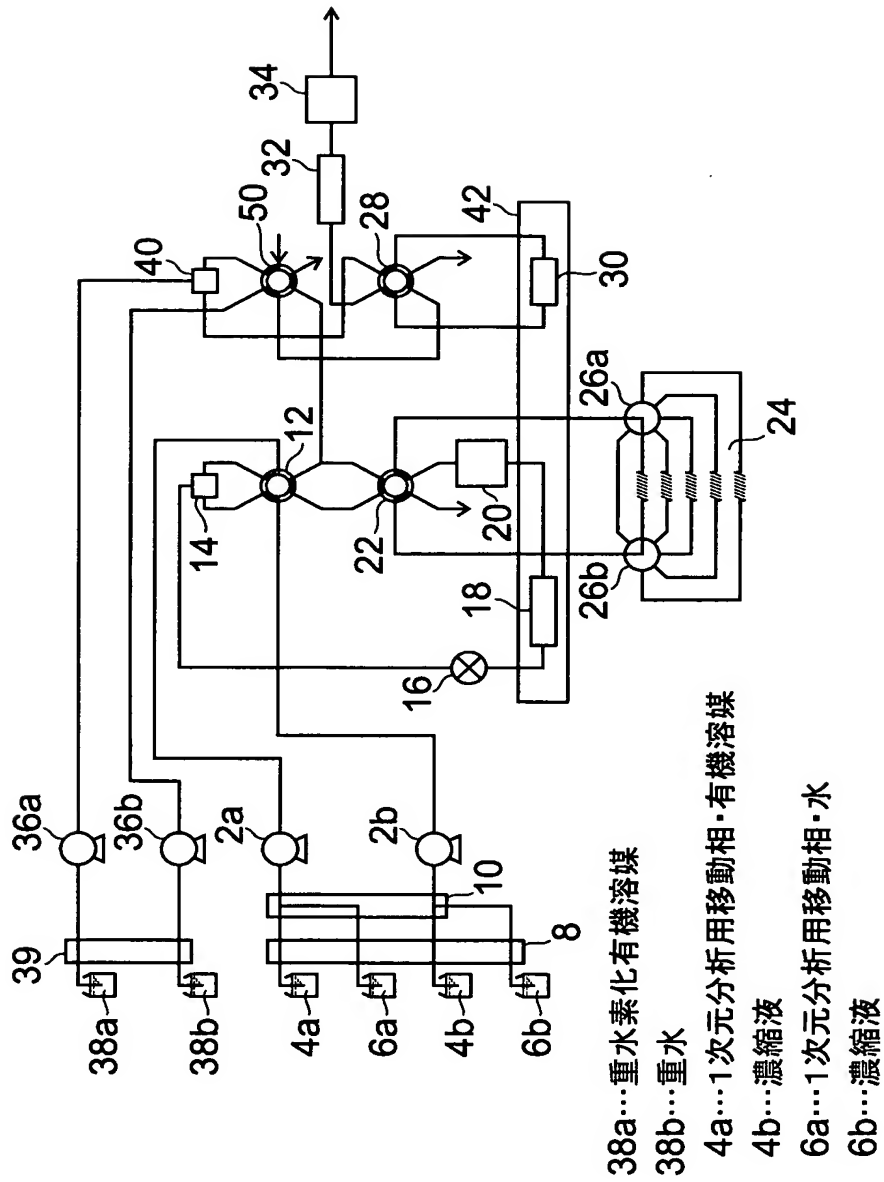


【図3】

(3)2次元目分析



【図 4】







【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 1次元目の分析で分画された試料成分をトラップカラムへ導く際の希釈率を自由に設定できるようにする。

【解決手段】 希釈液 6 a と 6 b が送液ポンプ 2 a と 2 b によって供給される。送液ポンプ 2 b により供給される希釈液は切替えバルブ 1 2, 2 2 を通って分配バルブ 2 6 b から所定のフラクシヨンループ 2 4 を通り、そのフラクシヨンループ 2 4 に保持されていた分画成分と移動相が切替えバルブ 2 6 a から切替えバルブ 2 2, 2 8 を通り、トラップカラム 3 0 に導かれる。このとき、希釈液 6 a がポンプ 2 a から切替えバルブ 1 2 を経て供給され、フラクシヨンループ 2 4 を経た流路と合流し、その流路からの移動相を希釈しながらトラップカラム 3 0 へ導かれる。トラップカラム 3 0 では試料成分が捕捉されることにより濃縮されていく。

【選択図】 図 2

特願 2 0 0 2 - 3 7 5 1 0 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 1 9 9 3 ]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 2 7 日

[変更理由]

新規登録

住 所

京都府京都市中京区西ノ京桑原町 1 番地

氏 名

株式会社島津製作所

特願 2 0 0 2 - 3 7 5 1 0 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 0 2 1 7 ]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 2 9 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都文京区小石川4丁目6番10号

氏 名

エーザイ株式会社